

И. И. Краснюк¹, В. В. Тарасов¹, Ж. М. Козлова¹, О. И. Степанова¹,
И. И. Краснюк (мл.), В. В. Кугач²

ВЫБОР КРИОПРОТЕКТОРА ДЛЯ ЛИОФИЛИЗАЦИИ ТРИТИКАИНА- α

¹ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет), г. Москва, Российская Федерация

²Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
г. Витебск, Республика Беларусь

Настоящая работа посвящена выбору криопротектора при лиофилизации рекомбинантного белка тритикаина- α . Для улучшения характеристик лиофилизата использовали криопротекторы маннитол и поливинилпирролидон (ПВП). Замораживание смесей осуществляли в морозильнике Sanyo Ultra Low MDF-U3086S; сушку проводили в лиофильной сушилке производства Jouan LP-3, Франция. Качество полученного лиофилизата оценивали по внешнему виду с применением оптической микроскопии в поляризованном свете и способности лиофилизата к разрушению. Установлено, что введение в состав лиофилизата тритикаина- α маннитола способствует получению измельчаемой массы, однако она имеет волокнистую структуру. Качество лиофилизата улучшает ПВП, который в смеси с маннитолом обеспечивает его кристалличность и хрупкость. Требуемая хрупкость лиофилизата достигается при соотношении компонентов тритикаин- α – маннитол – ПВП 50:25:25 соответственно.

Ключевые слова: лиофилизация, тритикаин- α , криопротекторы, маннитол, поливинилпирролидон, лекарственный препарат.

ВВЕДЕНИЕ

Ллиофилизация (сушка сублимацией) – широко известная технология сушки, которая хорошо подходит для термолабильных лекарственных препаратов как химического, так и биологического происхождения. Во время процесса сушки сублимацией исходный жидкий раствор сначала замораживается, а затем вода (как самый распространенный растворитель) отделяется в сушильной камере в условиях низкого парциального давления, при котором лед превращается в пар. Остается сухая пористая масса определенного объема, равная количеству вещества в исходном растворе. После правильно осуществленного цикла продукция остается стабильной в течение длительного времени и перед употреблением может быть восстановлена при помощи очень быстрой регидратации [1].

По своему принципу лиофилизация является комплексным процессом, на результат которого могут оказывать влияние различные факторы, в том числе и состав раствора, подлежащего сушке. Метод лиофилизации имеет ряд недостатков, связанных с физическими процессами, происходящими во время замораживания, первичной сублимации и досушивания.

Например, явления сверхконцентрации, кристаллизации или изменения конформации белка при удалении воды из гидратной оболочки [2, 3].

С одной стороны, лиофилизация является методом, наиболее подходящим для обеспечения стабильности белка при длительном хранении за счет подавления процессов гидролиза пептидной связи, дезаминирования. С другой стороны, сам процесс может вызвать повреждение белка, так как замораживание и сушка вызывают его стресс. Во время замораживания концентрация всех растворенных веществ резко возрастает. Эта локализованная высокая концентрация (сверхконцентрация) может привести к денатурации белка и, следовательно, после регидратации привести к образованию агрегатов, особенно если присутствует остаточная влага. Степень агрегации, отмеченная после регидратации, напрямую связана со степенью разворачивания белка в высушенном состоянии [3, 4].

Поэтому для предотвращения нежелательных эффектов на протяжении процесса лиофилизации необходимо использовать криопротекторы.

Криопротекторы – вещества, обладающие способностью предупреждать разви-

тие криоповреждений биологических объектов после размораживания или в процессе лиофилизации [5].

Криопротекторы применяют для поддержания стабильности фармацевтической субстанции, преимущественно во время замораживания и частично – первичной сублимации. Эффективный криопротектор должен обладать следующими свойствами: быть нетоксичным, хорошо растворяться в воде и растворах электролитов, снижать количество вымораживаемой воды в виде чистого льда и полностью предотвращать ее кристаллизацию из эвтектической смеси «криопротектор - вода». При этом он должен поддерживать в растворенном состоянии соли и белки вплоть до эвтектического перехода в аморфное состояние, то есть его растворы должны иметь низкую эвтектическую температуру, чтобы сократить температурный интервал воздействия твердой фазы на структуру вещества в процессе замораживания и отогрева. Важным свойством криопротекторов является также их способность влиять на процессы кристаллизации, облегчая формирование мелкокристаллического льда [3, 4].

К эффективным криопротекторам относятся соединения, принадлежащие к разным классам химических соединений: спиртам (этиленгликоль, а-пропиленгликоль, глицерин), амидам (диметилацетамид), оксидам (диметилсульфоксид), полимерам (поливинилпирролидон, полиэтиленгликоль), углеводам (сахароза, лактоза, трегалоза и др.), полиолам (маннит, сорбит) и др.

При лиофилизации биологических продуктов используют эндоцеллюлярные, экзоцеллюлярные и смешанные криопротекторы. Механизм действия эндоцеллюлярных криопротекторов реализуется за счет связывания внутриклеточной воды при быстром проникновении через мембрану [3, 8].

Маннит и другие полиолы используются как криопротекторы в технологии лиофилизации из-за своей способности кристаллизоваться во время замораживания и сохранять макроскопическую структуру лиофилизата в широком диапазоне температур [6, 7]. ПВП относится к экзоцеллюлярным криопротекторам. Он связывает внеклеточную воду и при замораживании замедляет рост внеклеточных кристаллов льда, обволакивает клетки и препятствует воздействию на них уже сформировавшихся кристаллов [3, 8].

Целью данной работы является выбор оптимального криопротектора для получения стабильной фармацевтической субстанции – рекомбинантного белка тритикаина- α .

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись рекомбинантный белок тритикаин- α , криопротекторы маннит/маннитол (Pearlitol®, Roquette, Франция), поливинилпирролидон (ПВП), смеси тритикаин- α с маннитолом и ПВП.

Тритикаин- α представляет собой смесь белков, состоящих из полипептида с молекулярной массой ~ 42 кДа, содержащего в первичной структуре аминокислотную последовательность продомена тритикаина- α , слитную с протеиназным доменом тритикаина- α . Он также имеет в своем составе продукты автокаталитического протеолиза: полипептид с молекулярной массой ~ 30 кДа, содержащий в первичной структуре аминокислотную последовательность протеиназного домена тритикаина- α , и пептиды с молекулярной массой ~11–12 кДа, представляющие отщепленные последовательности продомена тритикаина- α (ФГАО ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова).

Замораживание смесей осуществляли в морозильнике Sanyo Ultra Low MDF-U3086S и лиофилизацию проводили в условиях быстрого замораживания в лиофильной сушилке Jouan LP-3, Франция.

Для получения лиофилизата рекомбинантный белок тритикаин- α , сконцентрированный на ячейке Amicon с мембраной PM-10 (Millipore) с последующим диализом против фосфатно-солевого буфера (PBS, pH 7,4; $t = 4^\circ\text{C}$; время экспозиции 18 ч), аликвотировали по стеклянным флаконам, герметично закрывали. Смесь замораживали при температуре -70°C (не менее 2 ч) в морозильнике и помещали в установку для лиофилизации. Процесс лиофилизации проводили в течение 24 ч при температуре испарителя -50°C и вакууме 0,03–0,04 миллибар. По окончании процесса лиофильного высушивания флаконы вскрывали. Сублимационно высушенный рекомбинантный белок тритикаин- α в количестве 20 мг растворяли в 2,0 мл воды очищенной и добавляли по 10 мг маннитола и поливинилпирроли-

дона (ПВП), тщательно перемешивали до полного растворения. Флаконы герметично закрывали. Смесь замораживали при температуре -70°C (не менее 2 ч) в морозильнике и помещали в установку для лиофилизации. Процесс лиофилизации проводили в течение 24 ч при температуре испарителя -50°C и вакууме 0,03–0,04 миллибар. По окончании процесса лиофильного высушивания флаконы вскрывали.

Оценку качества полученного лиофилизата тритикаина- α оценивали по внешнему виду в соответствии с методикой определения кристалличности (оптическая микроскопия в поляризованном свете; ОФС 1.1.0018.15) [9] и способности к разрушению (измельчению). Для определения способности к разрушению полученный лиофилизат помещали в ступку, измельчали ударными движениями, избегая растирания.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение новой фармацевтической субстанции – рекомбинантного белка тритикаина- α – без вспомогательных веществ в процессе лиофилизации оказалось невозможным, так как его лиофилизат не соответствовал требованиям ГФ XIV. Лиофилизированная субстанция представляла собой волокна, не способные к измельчению (таблица, состав 1).

В связи с этим на первом этапе фармацевтической разработки необходимо было подобрать криопротектор для получения стабильного лиофилизата с целью создания нового лекарственного препарата в форме твердых капсул [10].

Добавление к тритикаину- α маннитола в количестве 10 % и 25 % привело к получению волокнистой массы в виде таблетки с незначительной способностью к разрушению (таблица, составы 2–3). Введение

Таблица. – Экспериментальные составы смеси тритикаина- α и криопротекторов и результаты исследований

№	Состав смеси	Соотношение компонентов (%)	Внешний вид	Способность к разрушению (измельчению)
1	Тритикаин- α	100	Лиофилизированная субстанция, волокнистая	Отсутствует
2	Тритикаин- α , маннитол	90 10	Лиофилизированная субстанция в виде таблетки, волокнистая	Незначительная
3	Тритикаин- α , маннитол	75 25	Лиофилизированная субстанция в виде таблетки, кристаллическая, с отдельными включениями волокон	При измельчении наблюдается волокнистость материала
4	Тритикаин- α , маннитол	50 50	Лиофилизированная субстанция в виде таблетки, кристаллическая	При измельчении материал пылит, образуя очень мелкую фракцию
5	Тритикаин- α , маннитол	25 75	Лиофилизированная субстанция в виде таблетки, кристаллическая	При измельчении материал пылит, образуя очень мелкую фракцию
6	Тритикаин- α , маннитол, ПВП	50 25 25	Лиофилизированная субстанция в виде таблетки, кристаллическая	Материал хрупкий, измельчается быстро, получается однородный порошок
7	Тритикаин- α , маннитол, ПВП	50 30 20	Лиофилизированная субстанция в виде таблетки, кристаллическая	Материал хрупкий, плотный, измельчается с большим усилием, получается однородный порошок
8	Тритикаин- α , маннитол, ПВП	50 40 10	Лиофилизированная субстанция в виде таблетки, кристаллическая	Материал хрупкий, плотный, измельчается с большим усилием, получается однородный порошок

в состав лиофилизата маннитола в количестве 50 % и 75 % улучшило кристаллические свойства лиофилизата, однако при измельчении материал пылил, образуя мелкую фракцию (таблица, составы 4–5).

В дальнейшем для улучшения свойств кристалличности и способности к разрушению в состав лиофилизата вводили ПВП. Лиофилизаты, содержащие 10 % и 20 % ПВП, представляли собой кристаллическую субстанцию в виде таблетки, при измельчении получался однородный порошок, однако материал был хрупким, плотным, для измельчения требовались большие усилия (таблица, составы 7–8).

И только введение в состав лиофилизата тритикаина- α ПВП в количестве 25 % при таком же содержании маннитола позволило получить фармацевтическую субстанцию, удовлетворяющую требованиям ГФ XIV: лиофилизированная субстанция в виде таблетки, кристаллическая; материал хрупкий, измельчается быстро, получается однородный порошок (таблица, состав 6).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлено влияние криопротекторов маннитола и ПВП на качество лиофилизата рекомбинантного белка тритикаина- α : с увеличением содержания маннитола увеличивается способность лиофилизата к измельчению, однако растет количество пылевидной фракции. Введение в состав лиофилизата ПВП в количестве 10 % и 20 % увеличивает его твердость. Требуемая хрупкость обеспечивается следующим соотношением ингредиентов лиофилизата: тритикаин- α : маннитол : ПВП 50:25:25. Данный состав лиофилизированного рекомбинантного белка тритикаина- α рекомендуется для дальнейших исследований и создания лекарственной формы.

SUMMARY

I. I. Krasnyuk, V. V. Tarasov,
Zh. M. Kozlova, O. I. Stepanova,
I. I. Krasnyuk (jn.), V. V. Kuhach
THE CHOICE OF A CRYOPROTECTOR
FOR TRITICAIN- α LYOPHILIZATION

The present work is devoted to the choice of a cryoprotector in lyophilization of a recombinant protein of triticain- α . Cryoprotectors mannitol and polyvinylpyrrolidone (PVP) were used to improve lyophi-

lize characteristics. Freezing of mixtures was carried out in a freezer Sanyo Ultra Low MDF-U3086S; drying was made in lyophilization manufactured by Jouan LP-3, France. The quality of the obtained lyophilizate was evaluated by its appearance using optical microscopy in polarized light and the ability of lyophilizate for destruction. It is established that introduction of triticain - α mannitol contributes to obtaining of the crushed weight but it has a fibrous structure. The quality of lyophilizate increases PVP which together with mannitol provides its crystallinity and fragility. The required fragility of lyophilizate is achieved when the ratio of triticain- α - mannitol - PVP components is 50:25:25 respectively.

Keywords: lyophilization, triticain- α , cryoprotectors, mannitol, polyvinylpyrrolidone, drug.

ЛИТЕРАТУРА

1. Могилук, В. Аспекты лиофилизационной сушки растворов / В. Могилук // Фармацевтическая отрасль. – 2014. – № 5 (46). – С. 46–52.
2. Блынская, Е. В. Технологические подходы к совершенствованию процесса лиофилизации белковых и пептидных лекарственных препаратов / Е. В. Блынская, С. В. Тишков, К. В. Алексеев // Российский биотерапевтический журнал. – 2017. – № 1. – С. 6–11
3. Wolfe, J. Cryobiology and anhydrobiology of cells / J. Wolfe, G. Bryant [Electronic resouse]. – Mode of access: <http://newt.phys.unsw.edu.au/~jw/cryoblurb.html>. – Date of access: 14.01.2019.
4. Влияние предварительного охлаждения на эффективность криоконсервации ГСК / Е. В. Коротаев [и др.] // Вестник гематологии. – 2014. – № 3. – С. 33.
5. Вспомогательные вещества в технологии лиофилизации пептидов и белков / Е. В. Блынская [и др.] // Фармация. – 2017. – Т. 66, № 1. – С. 14–18.
6. Аршинова, О. Ю. Вспомогательные вещества в технологии лиофилизации лекарственных препаратов / О. Ю. Аршинова, Н. А. Оборотова, Е. В. Санарова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. – № 1 (2). – С. 20–24.
7. Giering, G. Маннитол – многогранный эксципиент для производства твердых лекарственных форм / G. Giering, Н. Ключ-

ева // Фармацевтическая отрасль. – 2015. – № 5 (52). – С. 67–75.

8. Способ модификации процесса формирования кристаллов лекарственного вещества: пат. RU 2388757 / ВИКХУЗЕН Дирк (DE), ПФЕФФЕР Забине (DE). – опубл. 10.05.2010.

9. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд., Т. II. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>. – Дата доступа: 14.01.2019.

10. CH Q8. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Require-

ments for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, 2005. – 28 p.

Адрес для корреспонденции:

121019, Российская Федерация,
г. Москва, Никитский б-р, 13,
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России (Сеченовский Университет),
Институт фармации,
кафедра фармацевтической технологии,
тел.: 89260122191,
e-mail: aganusya1@yandex.ru,
Козлова Ж. М.

Поступила 12.02.2019 г.

**И. И. Краснюк¹, В. В. Тарасов¹, Ж. М. Козлова¹, О. И. Степанова¹,
И. И. Краснюк (мл), В. В. Кугач²**

**ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
ТРИТИКАИНА- α**

**¹ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет), г. Москва, Российская Федерация**

**²Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
г. Витебск, Республика Беларусь**

Настоящая работа посвящена изучению физико-химических и технологических свойств тритикаина- α с целью дальнейшей разработки лекарственного препарата в виде твердых капсул для лечения целиакии. В качестве объекта исследования применяли лиофилизированный порошок рекомбинантного белка тритикаина- α в сочетании с маннитолом и поливинилпирролидоном (ПВП). Исследование проводили в соответствии с требованиями общих фармакопейных статей Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV изд. (ГФ XIV). Тритикаин- α растворим в воде очищенной, растворимость в спирте снижается при увеличении концентрации спирта. Определение сыпучести, угла естественного откоса, насыпной плотности, пористости, расчет индексов Каррра и Хауснера продемонстрировали хорошую степень сыпучести исследуемой фармацевтической субстанции. В связи с волокнистым характером структуры белка при разработке лекарственной формы потребуется введение вспомогательных веществ для повышения степени сыпучести до очень хорошей или превосходной.

Ключевые слова: тритикаин- α , рекомбинантный белок, целиакия, физико-химические и технологические свойства, разработка капсул, оценка качества.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время эпидемиологические данные указывают на значительную распространенность целиакии (болезнь Ги – Гертера – Гейбнера, или инфантилизм кишечный). Целиакия – хроническая генетически детерминированная аутоиммунная Т-клеточно опос-

редованная энтеропатия, которая характеризуется стойкой непереносимостью специфических белков эндосперма зерна некоторых злаковых культур с развитием гиперрегенераторной атрофии слизистой оболочки тонкой кишки и связанного с ней синдрома мальабсорбции. Целиакия встречается с частотой 1: 300 – 1: 3700. Женщины болеют почти